

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和63年(1988)9月16日

G 01 N 27/26

C-6923-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑥ 発明の名称 電気泳動装置用回収セル

⑦ 特 願 昭62-57590

⑧ 出 願 昭62(1987)3月12日

⑨ 発 明 者 吉 永 光 一 静岡県焼津市坂本411-6

⑩ 出 願 人 草 野 博 東京都墨田区向島4丁目26番11号

⑪ 代 理 人 弁理士 佐藤 一雄 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

電気泳動装置用回収セル

2. 特許請求の範囲

電気泳動装置の一方の電極に連通し、試料ゲルを収容するゲル室と、ガラスフィルターを介して該ゲル室と隣接すると共に、セロファン膜を介して電気泳動装置の対極に連通し、該ガラスフィルターを透過した荷電高分子を回収するための回収室と、該ゲル室と該回収室とを収容する中空セル本体とからなり、該セル本体と該ガラスフィルターとセロファン膜とが一体化され、該ガラスフィルターが微小ゲル断片の透過を妨げるが該荷電高分子を透過し、該セロファン膜が該荷電高分子の透過を妨げることを特徴とする電気泳動装置用回収セル。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は、電気泳動装置に用いる回収セルに関し、より詳細には、DNAなどの荷電高分子を電気泳動によって分離する際に用いられる電気泳動装置用回収セルに関する。

〔従来技術〕

DNAなどの荷電高分子を電気泳動によって分離することは、制限酵素などで切断したDNA断片のうちから特定の断片(特定の遺伝子)を分け取る遺伝子工学の基本的な操作に用いられている。この操作では、DNA断片がアガロース若しくはポリアクリルアミドのゲルを担体とする電気泳動によって、DNA断片の長さの違いによって展開され、対応するゲルから目的のDNAを水溶液として回収される。この回収は、例えば、目的のDNA断片を含むゲルのブロックを切出し、そのブロックを透析チュービングの中に少量の電気泳動バッファーと共に封じ込め、この封じ込めたものを水平型電気泳動槽のバッファーに浸漬し、電気

泳動して電荷をもつDNAを電気的にゲルからバッファーに出し、DNAを含むバッファーを取出してDNAを回収する。

〔発明が解決しようとする問題点〕

前記した透析チュービングを用いるDNA回収では、特に、アガロースゲルを用いた場合、その回収操作中にゲルの微小断片が回収したDNA中に混入し、これが制限酵素の阻害剤となり、しかも、この阻害剤を簡単な精製操作で取除くことができないために、せっかく回収したDNAを有効に使用することができなくなる恐れがある。また、DNAの回収率は必ずしも良くなく、10%以下のように非常に悪いことがある。さらに、扱うゲルが非常に脆弱であり、そのゲルを収納する透析チュービングが軟弱であるために、その操作は繁雑かつ注意を要するものである。

この発明は上述の背景に基いてなされたものであり、その目的とするところはゲル微小断片などの阻害物質の混入を防止し、DNAなどの荷電高分子を操作容易に高い収率で回収することのでき

る電気泳動装置用回収セルを提供することである。
〔問題点を解決するための手段〕

本発明者は、電気泳動装置を用いた荷電高分子の回収手段について種々の検討を加えた結果、この発明による電気泳動装置用回収セルによって上記の目的が達成されることを見出した。すなわち、この発明の電気泳動装置用回収セルは、電気泳動装置の一方の電極に連通し、試料ゲルを収容するゲル室と、ガラスフィルターを介して該ゲル室と隣接すると共に、セロファン膜を介して電気泳動装置の対極に連通し、該ガラスフィルターを透過した荷電高分子を回収するための回収室と、該ゲル室と該回収室とを収容する中空セル本体とからなり、該セル本体と該ガラスフィルターとセロファン膜とが一体化され、該ガラスフィルターが微小ゲル断片の透過を妨げるが該荷電高分子を透過し、該セロファン膜が該荷電高分子の透過を妨げることを特徴とするものである。

〔作 用〕

上記のようにこの発明が構成されているので、

この回収セルを電気泳動装置の電気泳動槽に設置し、ゲル室側を負極として通電して、DNAなどの荷電高分子を含むゲルを電気泳動にかけると、負電荷をもつ荷電高分子はゲル中を回収室に移動して、ガラスフィルターを透過して回収室に移る。更に、正極側に移動しようとするが、回収室のセロファン膜は荷電高分子がその膜を透過させないので、荷電高分子は回収室に止まる。一方、微小ゲル断片も荷電高分子をと共に移動するが、ガラスフィルターによってその微小ゲル断片が回収室に混入するのを防止する。

〔実施例〕

この発明を、図面を参照しながら、より具体的に説明する。

装置例

第1図にこの発明による電気泳動装置用回収セルの一例を表す斜視図を示す。

この例回収セル13は、電気泳動装置の一方の電極に連通し、試料ゲルを収容するゲル室1と、ガラスフィルター2を介して該ゲル室1と隣接す

る回収室4とからなり、この回収室4は、セロファン膜3を介して電気泳動装置の対極に連通し、ゲル室から電気泳動した荷電高分子を貯留・回収するためのものである。このゲル室1と回収室4とは中空セル本体5に収容され、この中空セル本体5にガラスフィルター2とセロファン膜3とが一体化されている。

この回収セルの形状、寸法などは、この例に限定されず、その用途に応じて適宜変更することができ、同様にゲル室および回収室の形状、寸法なども、その用途に応じて適宜変更することが望ましい。

中空セル本体の材質には、この回収セルの目的に反しない限り、種々の材料を用いることができる。その様なものとして、プラスチック、ステンレス鋼などの金属、ガラス、セラミックなどがある。

この発明において用いられるガラスフィルターは、電気泳動中に微小ゲル断片の透過を妨げるものであり、その様な働きを持つかぎり、種々のガ

ラスフィルターをこの回収セルに用いることができる。同様に、セロファン膜は、電気泳動中に荷電高分子の通過を妨げるものであり、その様な働きを持つかぎり、種々のセロファン膜をこの回収セルに用いることができる。

使用例

第2図を参照して、この回収セルを使用する例を説明する。

まず、電気泳動バッファー11で満たされた水平型の電気泳動装置の電気泳動槽10を準備し、その電気泳動槽10に、ゲル室1に目的の荷電高分子を含むゲル12を収容する回収セル13をセットする。ゲル室1側を負極とし、回収室4側を正極として通電して電気泳動を行う。負電荷を持つ荷電高分子はゲル中を回収室4方向に動き、ガラスフィルター2を通過して回収室4に移る。回収室の正極側にあるセロファン膜3は荷電高分子を通過させないので、荷電高分子はセロファン膜上に止まる。電気泳動中に荷電高分子と共に移動する微小ゲル断片はガラスフィルター2を通過で

の性能を有していた。

分かく分子量	10,000~20,000
膜厚	0.020mm

電気泳動バッファーとして0.04モル/lのトリス・アセテート、0.001モル/lのEDTAを用いて、13cmの電極間距離を持つ水平型の電気泳動装置で100V、2時間、電気泳動槽の外側から水で冷却しながら、通電した。電気泳動終了後、回収室からバッファーとともにDNAを取出し、フェノール、クロロホルム処理し、DNAをエタノールで沈澱させ、そのDNAを再度0.1mlのTEバッファーに溶解させた。

DNAの回収率を測定するために、制限酵素HindIIIで分解したλ-DNA1μg(分離に用いた1/10量)と、前記実験で回収された各DNA断片を含むバッファーの各々の1/10量とについて電気泳動を行った。その結果を参考写真1に示す。参考写真1は電気泳動後のゲルをトランスイミネータの上に載せて撮影したものであり、レーン1は、分離前の全てのDNA断片を含む試料

きずゲル室1内に残る。電気泳動を終えると、セロファン膜上にある荷電高分子は、電流を逆転させて短時間通電してセロファン膜から離して、回収出口14からバッファーと共に回収荷電高分子を取出す。

実験例1

第1図に示す様な回収セルに、制限酵素HindIIIで分解したλ-DNA約10μgを1%のアガロースNA(Pharmacia)で電気泳動した。各DNA断片を含むアガロースのブロックを切出し、第1図に示す様な回収セルに入れて電気泳動を行った。この回収セルに用いられたガラスフィルター(ワットマン社製、GF/F)は、下記の性能を有していた。

重量	75g/m ²
厚さ	0.50mm
粒子保持能(液体)	0.7μm
初期ろ過速度	6.0ml/sec

一方、セロファン膜(ユニオンカーバイド社製、セロファンチューブリングシームレス)は、下記

についての電気泳動の結果であり、同様に、レーン2は23.1Kbp(分子量 15.0×10^6)のDNA断片について、レーン3は9.4Kbp(分子量 6.12×10^6)のDNA断片について、レーン4は6.56Kbp(分子量 4.26×10^6)のDNA断片について、レーン5は4.36Kbp(分子量 2.84×10^6)のDNA断片について、レーン6は2.32Kbp(分子量 1.51×10^6)のDNA断片について、レーン7は2.03Kbp(分子量 1.32×10^6)のDNA断片についてである。

レーン1と対応する各レーンとのバンドの濃さが等しいことから、これらすべてのDNA断片が100%の回収率で回収されたことが分る。

上記のDNAの分離回収の適用範囲が23.1Kbpから2.03Kbpであるが、100bpまでのものについても同様に実施できる。

実験例2

この回収セルで回収したDNAに酵素阻害剤が混入されている程度を調べるために、回収室から

取出した9.4KbpのDNA断片を色々な程度に精製した後、ライゲーション反応または制限酵素EcoRI切断を行った。その結果をアガロース電気泳動で測定した。その電気泳動結果を参考写真2に示す。レーン1は9.4KbpのDNA断片についての電気泳動結果を示し、レーン2は9.4KbpのDNA断片をそのままライゲーションしたものについての電気泳動結果を示し、レーン6は9.4KbpのDNA断片をそのまま制限酵素EcoRI切断したものについての電気泳動結果を示し、レーン4は9.4KbpのDNA断片を一度フェノール、クロロホルム処理で精製し、それをライゲーションしたものについての電気泳動結果を示し、レーン7は9.4KbpのDNA断片を一度フェノール、クロロホルム処理で精製し、それを制限酵素EcoRI切断したものについての電気泳動結果を示し、レーン5は基準となるマーカーDNAについての電気泳動結果を示す。この結果から回収したDNAに僅かに混入したリガーゼやEcoRIの阻害剤もフェノール、

クロロホルム処理によって簡単に取除けることがわかる。

(発明の効果)

この発明の電気泳動装置用回収セルによって、下記の効果を得ることができる。

(1) 実施例で実証されるように、DNAを100%若しくはそれに近い高率で回収することができる。

(2) 実施例で実証されるように、回収されたDNAには微量の阻害剤しか含まれておらず、しかもこの阻害剤を簡単に取除くことができるので、回収DNAを用いてライゲーションあるいは制限酵素切断などの遺伝子操作を行うことができる。

(3) この発明の回収セルには、既にセロファン膜が一体化されているので、従来のセロファン袋を手で支えるなどの煩わしい操作を必要としない。また、DNA溶液を取出すときも、セロファン袋の口を開けるなどの操作を要せず、単にピペッターで簡単に取出すことができる。このように操作性に優れている。

(4) セロファン膜を直接手に触れることもないので、DNAを汚染させることもない。

(5) ラジオアイソトープ(RI)を使用する場合、特に作業者の安全に寄与する。

(6) RIで汚染された回収セル処理が簡単である。

(7) この発明の回収セルは、工業的に均質な製品として製造することができるので、再現性のよい高回収率を可能にする。

(8) 高価な材料を特に必要とせずに製造することができるので、廉価な回収セルをえることができる。

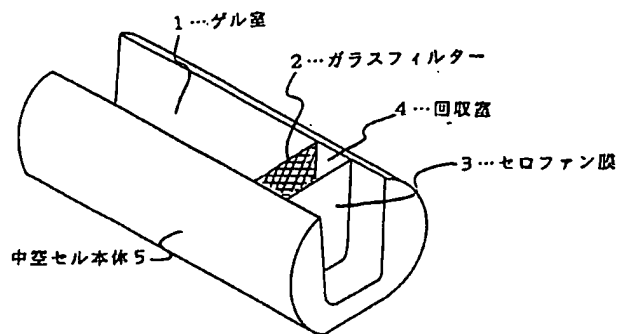
電気泳動槽、11…バッファー、12…ゲル、13…回収セル、14…取出口

出願人代理人 佐 藤 一 雄

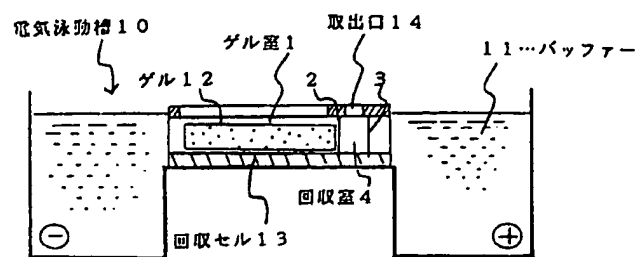
4. 図面の簡単な説明

第1図はこの発明による電気泳動装置用回収セルの一態様例を示す外観図、第2図はこの発明による回収セルを用いた電気泳動を示す断面図である。

1…ゲル室、2…ガラスフィルター、3…セロファン膜、4…回収室、5…中空セル本体、10…



第1図



第2図